





© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Syarat mutu	1
5 Pengambilan contoh	2
6 Cara uji	2
7 Syarat lulus uji	2
8 Higiene.....	3
9 Pengemasan.....	3
10 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji tapioka	4
Bibliografi.....	34



Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Tapioka* ini merupakan revisi SNI 01-3451-1994, Tapioka. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan sebagai berikut:

- Menyesuaikan standar dengan perkembangan teknologi terutama dalam metode uji dan persyaratan mutu;
- Menyesuaikan standar dengan peraturan-peraturan baru yang berlaku;
- Melindungi konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi industri tapioka.

Standar ini dirumuskan dengan memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK. 00. 05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimal Cemaran Logam Berat dalam Makanan atau revisinya.
9. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimal Cemaran Mikroba dalam Makanan atau revisinya.

Standar dirumuskan oleh Panitia Teknis 67 - 04 Makanan dan Minuman Departemen Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 24 November 2009 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2010 sampai dengan tanggal 22 Juni 2010 dengan hasil akhir RASNI

Tapioka

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji tapioka.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

3.1

tapioka

pati yang diperoleh dari umbi tanaman ubi kayu (*Manihot* sp.)

4 Syarat mutu

Syarat mutu tapioka sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu tapioka

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bentuk	-	serbuk halus
1.2	Bau	-	normal
1.3	Warna	-	putih, khas tapioka
2	Kadar air (b/b)	%	maks. 14
3	Abu (b/b)	%	maks. 0,5
4	Serat kasar (b/b)	%	maks. 0,4
5	Kadar pati (b/b)	%	min.75
6	Derajat putih (MgO = 100)	-	min.91
7	Derajat asam	mL NaOH 1 N / 100 g	maks. 4
8	Cemaran logam		
8.1	Kadmium (Cd)	Mg/kg	maks. 0,2
8.2	Timbal (Pb)	Mg/kg	maks. 0,25
8.3	Timah (Sn)	Mg/kg	maks. 40
8.4	Merkuri (Hg)	Mg/kg	maks. 0,05
9	Cemaran arsen (As)	Mg/kg	maks. 0,5

Tabel 1 (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
10	Cemaran mikroba		
10.1	Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)	koloni/g	maks. 1×10^6
10.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	maks. 10
10.3	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	$< 1 \times 10^4$
10.4	Kapang	koloni/g	maks. 1×10^4

5 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan.

6 Cara uji

Cara uji untuk tapioka seperti di bawah ini:

- a) Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- b) Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bentuk sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.3
- c) Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- d) Cara uji abu sesuai Lampiran A.4
- e) Cara uji serat kasar sesuai lampiran A.5
- f) Cara uji kadar pati sesuai Lampiran A.6
- g) Cara uji derajat putih sesuai Lampiran A.7
- h) Cara uji derajat asam sesuai Lampiran A.8
- i) Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.9
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.9.3
- j) Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.10
- k) Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.11
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.11.1
 - Cara uji angka lempeng total (35 °C, 48 jam) sesuai Lampiran A.11.2
 - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.11.3
 - Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.11.4
 - Cara uji kapang sesuai Lampiran A.11.5

7 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 4.

8 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

9 Pengemasan

Tapioka dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

10 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji tapioka

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh tapioka dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh tapioka dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan tapioka dan ambil contoh sebanyak 400 g kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan**A.2.1 Bentuk****A.2.1.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan dan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Taburkan contoh uji secukupnya di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati dan raba contoh uji tersebut untuk mengetahui bentuknya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika teraba serbuk halus, maka hasil dinyatakan "serbuk halus"; dan
- b) jika teraba selain serbuk halus, maka hasil dinyatakan sesuai dengan pengamatan.

A.2.2 Bau**A.2.2.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas tapioka, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas tapioka, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.3 Warna**A.2.3.1 Prinsip**

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika berwarna putih khas tapioka, maka hasil dinyatakan "putih, khas tapioka"; dan
- b) jika terlihat selain warna putih khas tapioka, maka disebutkan warna yang diamati.

A.3 Kadar air**A.3.1 Prinsip**

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Cawan bertutup.

A.3.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan disamping cawan di dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 (satu) jam setelah suhu oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;

- d) tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2%, maka uji harus diulang kembali.

A.4 Abu

A.4.1 Prinsip

Abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih.

A.4.2 Peralatan

- a) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Cawan pengabuan.

A.4.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- b) masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- c) tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih dan diperoleh bobot tetap;
- d) pindahkan segera ke dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung abu dalam contoh.

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Abu (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100 \%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

A.4.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil perhitungan abu. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.5 Serat Kasar**A.5.1 Prinsip**

Serat kasar adalah bagian yang tidak dapat dihidrolisis oleh asam sulfat (H_2SO_4 1,25%) dan natrium hidroksida (NaOH 3,25%). Bagian tersebut dihitung secara gravimetri.

A.5.2 Peralatan

- a) Oven;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Pompa vakum;
- d) Pendingin tegak;
- e) Erlenmeyer 500 mL;
- f) Gelas piala;
- g) Corong *Buchner*;
- h) Mortar;
- i) Cawan alumunium atau porselen;
- j) Kertas saring tak berabu, dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 μm sampai dengan 25 μm ; dan
- k) Sudip atau sendok.

A.5.3 Pereaksi

- a) Larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1,25 %;
larutkan 13,02 mL H_2SO_4 p.a (96 %) ke dalam air suling, lalu tera hingga 1 000 mL.
- b) Larutan NaOH 3,25 %;
larutkan 3,25 g NaOH ke dalam 100 mL air suling;
- c) Petroleum eter; dan
- d) Etanol 96 %.

A.5.4 Cara kerja

- a) Timbang 2 g sampai dengan 4 g contoh (W) dan masukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL, tambahkan 50 mL larutan H_2SO_4 1,25% kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak;
- b) tambahkan 50 mL NaOH 3,25% kemudian didihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin tegak;
- c) dalam keadaan panas, saring dengan corong *Buchner* yang berisi kertas saring yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya;
- d) cuci endapan yang terdapat pada kertas saring berturut-turut dengan H_2SO_4 1,25% panas, air panas dan etanol 96%;

- e) angkat kertas saring beserta isinya, masukkan ke oven dan keringkan pada suhu 105 °C, dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (W_1);
- f) bila ternyata kadar serat kasar lebih besar dari 1%, abukan kertas saring beserta isinya, timbang sampai bobot tetap (W_2); dan
- g) lakukan pekerjaan duplo.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Serat kasar (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot endapan, dinyatakan dalam gram (g);
 W_2 adalah bobot abu, dinyatakan dalam gram (g);

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 3% dari nilai rata-rata hasil perhitungan serat kasar. Jika kisaran lebih besar dari 3%, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Kadar Pati

A.6.1 Prinsip

Hidrolisis karbohidrat menjadi monosakarida yang dapat mereduksikan Cu^{2+} menjadi Cu^{1+} . Kelebihan Cu^{2+} dapat dititar secara iodometri.

A.6.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) Pemanas listrik;
- c) Penangas air;
- d) Pendingin tegak;
- e) Stopwatch;
- f) Erlenmeyer 500 mL;
- g) Labu ukur 500 mL, 100 mL terkalibrasi;
- h) Corong;
- i) Gelas ukur;
- j) Buret;
- k) Pipet volumetrik 25 mL, 10 mL terkalibrasi; dan
- l) Pipet tetes.

A.6.3 Pereaksi

- a) Larutan asam klorida, HCl 3% dan 1 M;
- b) Larutan natrium hidroksida, NaOH 30% dan 1 M;
- c) Larutan asam asetat, CH_3COOH 3%
- d) Larutan *Luff-Scrhoorl*;
 larutkan 143,8 g Na_2CO_3 anhidrat dalam 300 mL air suling. Sambil aduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 mL air suling. Tambahkan 25 g terusi ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) yang telah dilarutkan dengan 100 mL air suling. Pindahkan larutan tersebut ke dalam labu 1 liter, tepatkan sampai tanda garis dengan air suling, dan kocok. Biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,1 N

- e) Larutan kalium iodida, KI 20%;
larutkan 20 g kalium iodida p.a. dengan air suling hingga 100 mL.
- f) Larutan asam sulfat, H_2SO_4 25%;
larutkan 138 mL H_2SO_4 p.a. (98%, A.j. 1,84) dengan 745 mL air suling.
- g) Larutan natrium tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1 N;
- larutkan 100 mL larutan natrium tiosulfat 1 N dengan air suling bebas CO_2 menjadi 1 L;
- pembuatan natrium tiosulfat 1 N;
Larutkan 248 g natrium tiosulfat 5 H_2O dengan air suling bebas CO_2 (yang sudah dididihkan terlebih dahulu) sehingga 1 L.
- standardisasi natrium tiosulfat 0,1 N.
- h) Larutan kanji 0,5%;
larutkan 0,50 g amilum dengan air panas menjadi 100 mL.
- i) Kertas lakmus;
- j) Indikator fenolftalein (PP);

A.6.4 Pengujian kepekatan larutan *Luff-Scrhoorl*

- a) Pipet 25 mL larutan *Luff-Scrhoorl* kemudian tambahkan 3 g KI dan 25 mL larutan H_2SO_4 6 N. Titar dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M dengan indikator larutan kanji 0,5%. Banyaknya larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ yang dipergunakan untuk titrasi adalah (25 ± 2) mL;
- b) Pipet 10 mL larutan *Luff-Scrhoorl* kemudian masukkan ke dalam labu ukur 100 mL, tepatkan larutan hingga tanda garis dengan air suling dan kocok (b). Pipet 10 mL larutan hasil pengenceran tersebut dan masukkan ke dalam Erlenmeyer berisi 25 mL HCl 0,1 N. Masukkan Erlenmeyer tersebut ke dalam penangas air mendidih dan biarkan selama 1 jam, kemudian angkat dan dinginkan. Encerkan dengan air suling dan titar dengan larutan NaOH 0,1 N dengan indikator PP;
- c) Pipet 10 mL larutan hasil pengenceran (b) masukkan ke dalam Erlenmeyer dan titar dengan HCL 0,1 M dengan indikator PP. Larutan HCL 0,1 M yang dipergunakan untuk titrasi harus di sekitar 6,0 mL sampai dengan 7,6 mL.
- d) Larutan *Luff-Scrhoorl* harus mempunyai pH 9,3 -9,4.

A.6.5 Cara kerja

- a) Timbang dengan seksama 5 g contoh ke dalam Erlenmeyer 500 mL;
- b) tambahkan 200 mL larutan HCl 3%, dan dididihkan selama 3 jam dengan pendingin tegak;
- c) dinginkan dan netralkan dengan larutan NaOH 30% (dengan lakmus atau fenoltalein), dan ditambahkan sedikit CH_3COOH 3% agar suasana larutan sedikit asam;
- d) pindahkan isinya ke dalam labu ukur 500 mL dan tepatkankan hingga tanda garis, kemudian saring;
- e) pipet 10 mL hasil saringan ke dalam Erlenmeyer 500 mL, tambahkan 25 mL larutan *luff* (dengan pipet) dan beberapa butir batu didih serta 15 mL air suling;
- f) panaskan campuran tersebut dengan nyala tetap. Usahakan agar larutan dapat mendidih dalam waktu 3 menit (gunakan *stopwatch*), dididihkan terus selama tepat 10 menit (dihitung dari saat mulai mendidih dan gunakan *stopwatch*) kemudian dengan cepat dinginkan dalam bak berisi es;
- g) setelah dingin tambahkan 15 mL larutan KI 20% dan 25 mL H_2SO_4 25% perlahan-lahan;
- h) titar secepatnya dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N dan tambahkan 2 mL sampai dengan 3 mL (V_1); dan
- i) lakukan pengerjaan untuk blanko, (V_2);
- j) hitung bobot glukosa dengan menggunakan Tabel A.1. Bobot glukosa setara dengan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang tereduksi,

A.6.6 Perhitungan

Kadar pati = 0,90 x kadar glukosa

dengan:

$$\text{Kadar glukosa} = \left(\frac{w \times fp}{w_1} \right) \times 100 \%$$

Keterangan :

w adalah bobot contoh, dinyatakan dalam milligram (mg);

w₁ adalah bobot glukosa berdasarkan Tabel A.3 dinyatakan dalam miligram (mg);

Jumlah Na₂S₂O₃ yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blanko (V₂) dengan volume titar vontoh (V₁);

fp adalah faktor pengenceran

Tabel A.1 – Ekvivalen natrium tiosulfat : metoda *Luff-Scrhoorl*

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N mL	Glukosa, fruktosa Gula inversi mg
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

A.7 Derajat putih

A.7.1 Prinsip

Pengukuran refleksi sinar contoh dengan standar MgO.

A.7.2 Peralatan

- a) Fotometer.

A.7.3 Pereaksi

- a) Standar MgO 99% p.a.

A.7.4 Cara kerja

- a) Masukkan contoh ke dalam wadah contoh yang sama dengan yang digunakan untuk wadah MgO;
- b) ukur refleksi indeks dari contoh (A) dan refleksi indeks MgO (B);
- c) setiap selesai pengukuran 10 kali contoh, fotometer harus dikalibrasi dengan MgO untuk mendapatkan deviasi yang lebih kecil.

A.7.5 Perhitungan

$$\text{Derajat putih} = \frac{A}{B} \times 100$$

Keterangan :

A adalah refleksi indeks contoh; dan
B adalah refleksi indeks MgO.

A.8 Derajat asam

A.8.1 Prinsip

Pelarutan asam-asam organik dalam contoh dengan menggunakan pelarut organik tertentu (alkohol 95%) dilanjutkan dengan penitrasi dengan basa (NaOH).

A.8.2 Peralatan

- a) Neraca analitik ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- b) Erlenmeyer 250 mL; dan
- c) Buret 25 mL.

A.8.3 Pereaksi

- a) Etanol, C₂H₅OH 95% netral;
- b) Larutan natrium hidroksida, NaOH, 0,05 M;
- c) Indikator fenolftalein, PP 1% dalam alkohol 60%.

A.8.4 Cara kerja

- Timbang dengan seksama 10 g contoh (a), kemudian masukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL;
- tambahkan 100 mL etanol 95% netral dan biarkan 24 jam sambil sesekali digoyangkan kemudian disaring; dan
- titrasi 50 mL saringan tersebut dengan NaOH 0,05 M (c) dalam etanol dengan menggunakan indikator PP (b).

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Derajat asam} = \frac{b \times c \times fp \times 100}{a} \text{ mL NaOH 1 N/ 100 g contoh}$$

Keterangan:

- adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- adalah volume NaOH 0,05 M yang digunakan dalam titrasi, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- adalah normalitas NaOH;
- adalah faktor pengenceran (100/50).

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil derajat asam. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan logam

A.9.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.9.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.9.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur kapasitas 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kwarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 sampai dengan 25 µm.

A.9.1.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam klorida, HCl pekat;
- c) Larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO_3 pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- d) Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda garis.
- e) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- f) Larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.9.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;

- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5) ^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.9.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL); dan

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.9.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.9.2 Timah (Sn)

A.9.2.1 Prinsip

Contoh didekstruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O}-\text{C}_2\text{H}_2$.

A.9.2.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- c) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- d) Pemanas listrik;
- e) Penangas air;
- f) Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- g) Pipet ukur berskala 0,1 mL terkalibrasi;
- h) Erlenmeyer 250 mL;
- i) Gelas ukur 50 mL; dan
- j) Gelas piala 250 mL.

A.9.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 mg/mL Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
Pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1000 mg/mL Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL; 15 µg/mL; 20 µg/mL dan 25 µg/mL Sn.

A.9.2.4 Cara Kerja

- Timbang contoh 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.9.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.9.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.9.3 Merkuri (Hg)

A.9.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH_4 atau SnCl_2 dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.9.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, dan 100 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.9.3.3 Preaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian 67 tambahkan mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,1354 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.

- j) Larutan baku 1 µg/mL Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 µg/mL Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 µg/mL.
- k) Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 µg/mL ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 µg/mL; 0,005 µg/mL; 0,01 µg/mL; 0,02 µg/mL Hg; dan
- l) Batu didih.

A.9.3.4 Cara kerja

A.9.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin,
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- f) didihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- i) pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.9.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;

- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.9.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran

A.9.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.10 Cemarkan arsen (As)

A.10.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.10.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- b) Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- c) *Microwave digester*;
- d) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- e) Pemanas listrik;
- f) *Burner* atau *bunsen*;
- g) Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- h) Labu terbuat dari borosiklat berdasar bulat 50 mL.
- i) Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- j) Gelas ukur 25 mL;
- k) Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- l) Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- m) Cawan porselen kapasitas 50 mL; dan
- n) Gelas piala 200 mL.

A.10.3 Pereaksi

- a) Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- b) Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- c) Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- d) Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- f) Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis ke dalam labu ukur 500 mL.
- g) Larutan asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan standar arsen 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.10.4 Cara kerja

A.10.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) kedalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;

- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.10.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam microwave digester dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan burner atau bunsen serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.10.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
fp adalah faktor pengenceran.

A.10.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.11 Cemarkan mikroba

A.11.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka lempeng total dan *Escherichia coli*

A.11.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.11.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2 000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi, dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettors*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting dan spatula steril.

A.11.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH_2PO_4 34 g
- air suling 500 mL

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer, 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 mL dan disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.11.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.11.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.11.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.11.2.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 mL, terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* atau *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.11.2.3 Pembenihan dan pengenceran

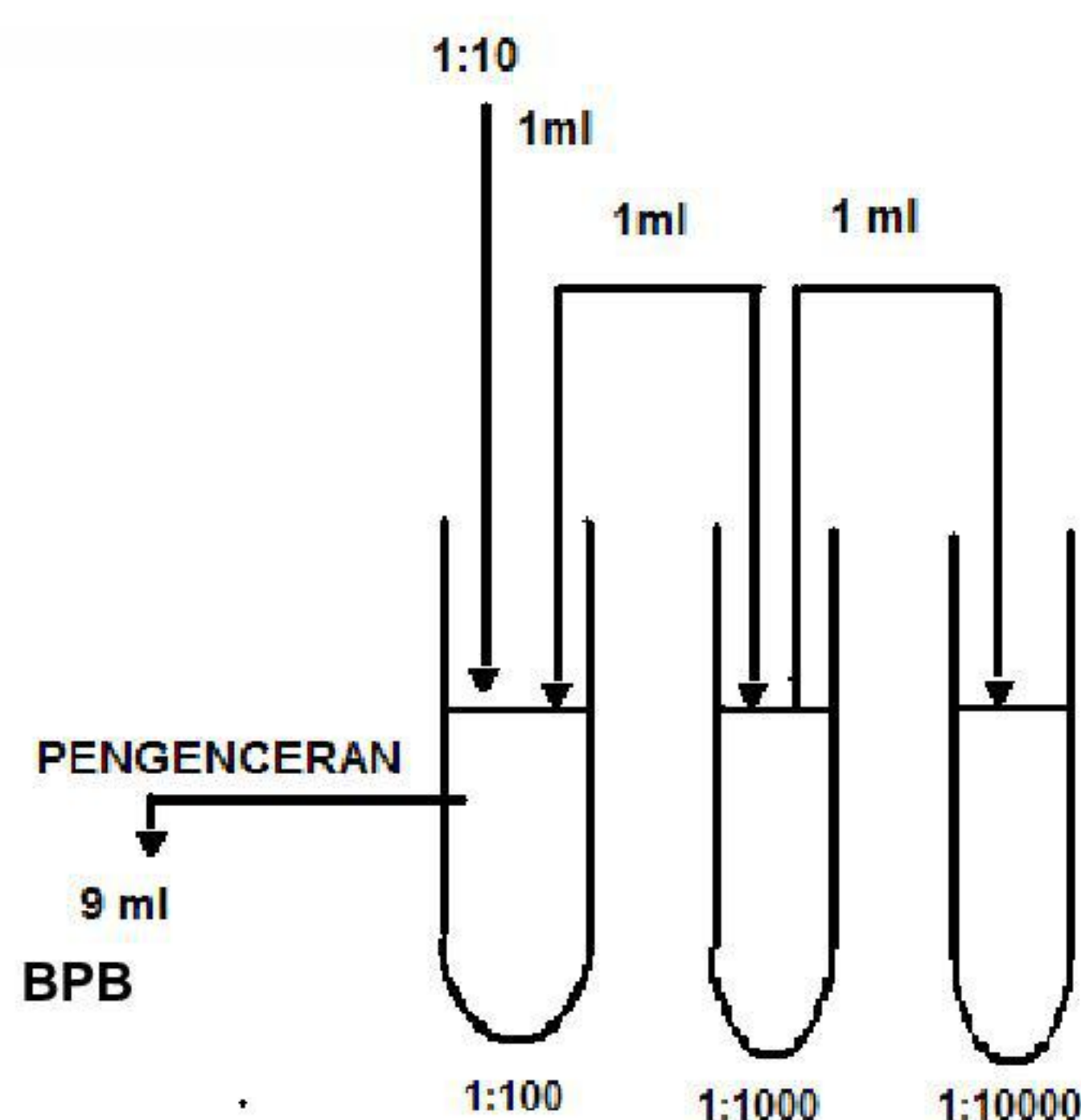
Plate count agar (PCA)

- | | |
|------------------------|----------|
| – <i>tryptone</i> | 5 g |
| – <i>yeast extract</i> | 2,5 g |
| – glukosa | 1 g |
| – agar | 15 g |
| – air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.11.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*;



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB)*

- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (10^{-1} sampai dengan 10^{-4}) ke dalam cawan petri steril secara duplo;

- c) tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- d) goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.11.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.11.2.6 Pernyataan hasil

A.11.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$\text{ALT} = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$\text{ALT} = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
 n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
 n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua; dan
 d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;

- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6.4 \times 10^5)$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6.5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5.9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan

- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu rantai, dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.11.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.11.3 *Escherichia coli*

A.11.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.11.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;
- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL steril berskala 0,1 mL;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir/plastik;
- f) Tabung reaksi dan tabung *Durham*;
- g) Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- h) Jarum Ose dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.11.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose (LST) broth / lauryl tryptose (LT) broth*;
- b) *Brilliant green lactose bile (BGLB) broth* 2%;
- c) *Escherichia coli (EC) broth*;
- d) *Agar Levine's eosin methylene blue (L-EMB)*;
- e) *Plate count agar (PCA)*;
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) *Pereaksi Kovacs'*;
- i) *Methyl red – Voges Proskauer (MR – VP) broth*;
- j) *Pereaksi Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1%;
- n) *Pereaksi indol*;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- p) *Butterfield's phosfat buffered dilution water (BPB)*;
- q) Larutan alfa naftol 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

A.11.3.4 Cara kerja

A.11.3.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *Escherichia coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.11.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *lauryl sulfate tryptose (LST) broth* yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan positif;
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan negatif, lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapa pun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut “positif”; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

A.11.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- Pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST *broth* yang positif ke dalam tabung EC *broth* yang berlainan;
- inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan positif;
- apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan positif; dan
- lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

A.11.3.4.3 APM - Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati;
- ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm;
- inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam;
- dari tiap cawan L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga pada tabung agar miring PCA;
- inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$ dan gunakan untuk uji selanjutnya;
- buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini, serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - uji indol;
 - Inokulasi tabung *tryptone (trptophane) broth*;
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs'; dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer* ;
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril;
 - tambahkan 0,6 mL larutan alfa naftol 5% dalam alkohol, dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin; dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil;
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung; dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah, dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - uji sitrat;
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan hati-hati menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain;
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu $35 ^\circ\text{C}$; dan

- uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
- uji pembentukan gas dari lactase.
 - Inokulasikan tabung LST *broth* dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ; dan
 - periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

A.11.3.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.2 - Reaksi biokimia *Escherichia Coli* pada uji IMVIC

<i>E. coli</i>	Indol	Merah metil	<i>Voges Proskauer</i>	Sitrat
Varietas I	+	+	-	-
Varietas II	-	+	-	-

- Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
 - uji IMVIC mengikuti pola + + - - atau - + - - sesuai dengan Tabel A.2;
 - pewarnaan Gram menunjukkan Gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
- Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.3 APM berdasarkan jumlah tabung - tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.3 - APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93

Tabel A.3 (lanjutan)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	>1 100

A.11.4 *Bacillus cereus*

A.11.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechitinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

A.11.4.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 2) °C dan (35 ± 2) °C terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- Penangas air, (48 – 50) °C;
- Mikroskop, *mikroscope slides*, dan *cover slips*;
- Alat penghitung koloni;
- Vorteks mixer*;
- Bunsen* besar dan kecil;
- Rak tabung biakan;
- Botol pengencer steril;
- Tabung anaerobik *GasPak*, dilengkapi dengan H₂ dan CO₂ *generator envelopes* dan katalisnya;
- Tabung biakan (ukuran 13 x 100 mm) steril;
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL, dan 1 mL, berskala 0,1 mL steril;
- Cawan petri berukuran minimal 15 x 100 mm steril,;
- Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area sebaran 45 mm sampai dengan 55 mm;
- Jarum Ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- Pena penanda.

A.11.4.3 Media dan pereaksi

- Agar mannitol-egg yolk-polymyxin* (MYP);
- Egg yolk emulsion*, 50%;
- Trypticase soy-polymyxin broth*;
- Larutan polimiksin B untuk agar MYP (0,1%) dan *trypticase soy-polymyxin broth* (0,15 %);
- Lisozim 0,001%;
- Phenol red glucOse broth*;
- Agar tirosin;
- Lysozyme broth*;
- Media *Voges-proskauer*;

- j) *Nutrient broth*;
- k) *Nitrate broth*;
- l) *Nutrient agar* (NA) untuk *B. Cereus*;
- m) Pereaksi *sulfanilic acid*;
- n) Pereaksi alfa naftol;
- o) *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) mL dan (90 ± 2) mL ;
- p) Pereaksi uji *Voges-Proskauer*;
- q) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.

A.11.4.4 Persiapan contoh

- a) Timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril secara aseptis, secara aseptis tambahkan 450 mL *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1:10).

A.11.4.5 Penetapan *Bacillus cereus*

A.11.4.5.1 APM – *Bacillus cereus*

- a) Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *Bacillus cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *Bacillus cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *trypticase soy-polymyxin broth*;
- c) inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu 30°C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus*;
- e) gores biakan dari tabung yang positif dengan Ose ke dalam media MYP agar dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 30°C ;
- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus*; dan
- g) Hitunglah APM *B. cereus* dengan menggunakan Tabel A.3 APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *B. cereus*.

A.11.4.5.2 Angka lempeng total - *Bacillus cereus*

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan memindahkan 10 mL contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 mL larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-6} ;
- b) inokulasi sebanyak 0,1 mL masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- c) MYP agar pada suhu 30°C selama 24 jam;
- d) amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- e) jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni,
- f) pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;

- g) beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. Cereus*;
- h) ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.11.4.6; dan
- i) hitunglah jumlah *B.cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{A}{B} \times F \times 10$$

Keterangan :

n adalah jumlah rata-rata koloni pada satu tingkat pengenceran;
 A adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B. cereus*;
 B adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B. cereus*;
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;
 10 adalah faktor pengenceran dari jumlah koloni yang diinokulasi (0,1 mL).

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus* maka :

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = 65 \times 4/5 \times 1.000 \times 10 = 520.000$$

A.11.4.6 Uji penegasan untuk *Bacillus cereus*

A.11.4.6.1 Biakan campuran

- a) Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media MYP agar dan pindahkan ke media agar miring untuk konfirmasi *B.cereus*;
- b) inkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C;
- c) lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *Bacillus cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;
- d) pindahkan biakan dengan Ose 3 mm dari setiap agar miring ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 mL larutan BPB steril kemudian dikocok dengan vorteks, untuk mensuspensikan biakan; dan
- e) suspensi biakan ini digunakan untuk konfirmasi *B. cereus* berikut:

A.11.4.6.2 Uji *phenol red glucose broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 3 mL *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- c) kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.11.4.6.3 Uji *nitrate broth*

- a) Inokulasikan 5 mL suspensi biakan menggunakan jarum Ose 3 mm;
- b) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;

- c) untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 mL masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi alfa naftol ke dalam setiap tabung; dan
- d) warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.11.4.6.4 Uji media *modified VP*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke dalam 5 mL media VP dalam tabung;
- b) inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- c) untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 mL biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 mm larutan alfa naftol, dan 0,2 mL KOH 40%;
- d) aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- e) amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- f) uji media *modified VP* positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

A.11.4.6.5 Uji agar tirosin

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- b) inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35°C ;
- c) amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- d) jika hasil uji negatif maka inkubasi dilanjutkan selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.11.4.6.6 Uji *lysozyme broth*

- a) Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* yang mengandung 0,001% lisozim;
- b) inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* sebagai kontrol positif;
- c) inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35°C ;
- d) amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- e) inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.11.4.6.7 Uji agar MYP

- a) Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- b) bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- c) inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm di setiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- d) biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C ;
- e) amati terbentuknya *lecitinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- f) mannitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan terbentuknya asam dari mannitol; dan
- g) koloni *Bacillus cereus* biasanya positif *lechinase* dan negatif mannitol pada agar MYP.

A.11.4.6.8 Hasil uji penegasan *Bacillus cereus*

Hasil uji penegasan sebagai *B. cereus* apabila:

- Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- menghasilkan *lechinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP;
- tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- menguraikan L-tirosin; dan
- tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0,001%.

A.11.5 Kapang**A.11.5.1 Prinsip**

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai setelah diinkubasi pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.11.5.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- pH meter;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL, steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Bent glass rod*.

A.11.5.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- Agar *dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1%; dan
 - pepton 1 g
 - air suling 1 000 ml
 larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu $121 ^\circ\text{C}$ selama 15 menit, dan atur pH sehingga mencapai pH akhir $(7,0 \pm 0,2)$.
- Larutan antibiotik.
Antibiotik ditambahkan dalam media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik karena stabil selama proses dalam diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang dianjurkan adalah 100 mg/L media. Jika terlihat pertumbuhan bakteri yang berlebihan, siapkan media dengan penambahan *chloramphenicol* 50 mg/L sebelum otoklaf dan *chlortetracycline* 50 mg/L steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.11.5.4 Persiapan dan homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10;
- kocok campuran beberapa kali hingga homogen.

A.11.5.5 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan menggunakan larutan pepton 0,1%;
- b) persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu media di bawah ini, yaitu :
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai Awkurang dari 95 :
pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- c) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni kapang setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada koloni yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam. Jangan menghitung cawan-cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder dari spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.11.5.5 Pernyataan hasil**A.11.5.5.1 Cara menghitung**

Hitung koloni kapang sesuai dengan A.11.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.11.5.5.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan sesuai dengan A.11.2.6.2 .

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 923.03, Ash of Flour*, 18th Edition, Chapter 32.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 920.86, Fiber (Crude) in Flour*, 18th Edition, Chapter 32.1.05.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercury in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 925.10, Solids (Total) and Moisture in Flour, Air Oven Method*. 18th Edition, Chapter 32.1.03.
- Badan Standardisasi Nasional. SNI 01 – 2894 – 1992. *Cara uji Makanan dan Minuman (butir 9)*.
- Badan Standardisasi Nasional. SNI 01 – 3595 – 1998. *Cara uji Minyak dan Lemak (butir 8)*.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.
- JIS Z8722. 2009. *Methods of Colour Measurement-reflecting and Transmitting Objects*.
- International Starch Institute. 2002. ISI 28-1e. *Determination of Reducing Sugar by Luff Schoorl Method*.





BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id